

# **CULTIVO *in vitro* DE YEMAS AXIARES DE PAPAYA (*Carica papaya* L.). II. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES PARA LA REGENERACION y MULTIPLICACION *in vitro* DE TALLOS<sup>1</sup>**

*Griselda Arrieta<sup>2</sup>, Eric Guevara<sup>3</sup>, Guillermo Sancho<sup>4</sup>*

## **RESUMEN**

**Cultivo *in vitro* de yemas axilares de papaya (*Carica papaya* L.). II. Determinación de las condiciones para la regeneración y multiplicación *in vitro* de tallos.** Se determinaron las condiciones para la multiplicación *in vitro* de yemas axilares provenientes de plantas de papaya de 4 a 6 meses de edad y de plantas en producción. Se estudió inicialmente la respuesta de los explantes en un medio MS bajo dos tipos de citoquininas: BAP (0,3 mg/l) y quinolina (1 mg/l). Posteriormente en la fase de multiplicación se estudió la combinación de estas sustancias con AG3 (1 mg/l) y ANA (0,05 y 0,10 mg/l). En presencia de BAP se observó una mayor formación y proliferación de yemas, que fue menor con quinolina. El subcultivo de los explantes en presencia únicamente de BAP promovió el desarrollo de tallos muy cortos, poco aptos para su enraizamiento. Tanto el AG3 como la quinolina no tuvieron efecto sobre la elongación de éstos. La combinación de BAP y de ANA (0,1 mg/l) fue el mejor medio para la multiplicación, al promover una mejor elongación de los tallos, con hojas de menor tamaño. Se analizan y discuten los resultados con relación a lo informado por otros autores.

Abreviaciones: BAP = 6-bencilaminopurina, AG3 = ácido giberélico, ANA- ácido naftalenacético.

**Palabras clave:** propagación vegetativa, cultivo *in vitro*, yema (planta), explantes, *Carica papaya*, sustancias de crecimiento vegetal, 6-benziladenina, quinolina, ácido giberélico, ácido naftilacético.

## **ABSTRACT**

***In vitro* culture of axillary buds of papaya (*Carica papaya* L.).II. Determination of conditions for *in vitro* stalk regenerating and multiplying.** The conditions for *in vitro* axillary bud multiplication from 4 to 6 months old and fruit bearing papaya plants were determined. The explants' response in a MS medium under two types of cytokinines: BAP (0.3 mg/l and kinetin (1 mg/l) was initially studied. Posteriorly, combinations of these substances with GA3 (1 mg/l) and NAA (0.05 and 0.1 mg/l) were tested. A larger formation and proliferation of buds was observed in the presence of BAP, but it was lower with kinetin. The sub-culture of explants, in the presence of BAP only, promoted the growth of very short stalks, not suited for rooting. Neither GA3 or kinetin had an elongating effect on them. The combination of BAP and NAA (0.1 mg/l) was the best multiplication medium, promoting the best stalk elongation with smaller sized leaves. The results are analyzed and discussed in relation to other authors' reports.

**Keywords:** vegetative propagation, *in vitro* culture, buds, explants, *Carica papaya*, plant growth substances, ba, kinetin, ga, naa.

<sup>1</sup> Esta investigación contó para su realización con recursos de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica. (Proyecto VI-736-89-032).

<sup>2</sup> CIGRAS, Universidad de Costa Rica.

<sup>3</sup> Miembro del Programa de Apoyo Financiero a Investigadores del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica.

<sup>4</sup> Ing. Agr. Estación Experimental Fabio Baudrit M., Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica.

## INTRODUCCION

La propagación de la papaya se realiza por medio de semillas, lo cual, sumado al alto grado de polinización cruzada que caracteriza a esta especie, produce una gran variabilidad del material genético, que incide directamente en la susceptibilidad a enfermedades, la calidad del fruto y en la producción.

El establecimiento de un programa de propagación clonal *in vitro* para papaya sería la vía más factible para disminuir esta variabilidad genética.

En la literatura se citan varios protocolos de propagación clonal de plantas de papaya *in vitro* a partir de yemas axilares y apicales (Drew y Smith 1986, Drew 1988, Litz y Connover 1978, DeWinaar 1988, Rajeevan y Pandey, 1986). Esta proliferación de sistemas, algunos de los cuales presentan diferencias importantes en cuanto a la metodología, responde a la dificultad de los investigadores en reproducir los resultados obtenidos por otros autores. Rajeevan y Pandey (1986), DeWinaar (1988) y, Sancho y Guevara (1991) no lograron regenerar plantas utilizando el procedimiento descrito por Litz y Connover (1978). Sancho y Guevara (1991) también evaluaron además los protocolos sugeridos por DeWinaar (1988) y por Guevara (1981), obteniendo una mejor respuesta con ambos medios, aunque no lograron una multiplicación continua ni la formación de raíces. Estos autores determinaron que, a pesar de emplear material vegetal de un mismo cultivar (por ejemplo el cultivar Solo), existen variaciones locales que pueden influir seriamente sobre la respuesta al cultivo *in vitro*. Conclusiones similares han sido expresadas, en cuanto al cultivo *in vitro* de otras especies, por Debergh (1987) y por Bangerth (Institut für Obst-, Gemüse und Weinbau, Universidad de Hohenheim, Stuttgart, Alemania. Comunicación personal 1995).

Es por esta razón que el objetivo de este trabajo fue estudiar los requerimientos necesarios para obtener y establecer en la papaya una multiplicación de tallos *in vitro* de manera satisfactoria y continua.

## MATERIALES Y METODOS

Dadas las dificultades encontradas por Sancho y Guevara (1991) con material vegetal adulto, se estudiaron dos tipos de material vegetal. El primero consistió de plantas con 3-4 meses de edad, para definir mejor los requerimientos de los explantes de papaya. La información obtenida fue utilizada como base para el estudio con el segundo material, que consistió de yemas de plantas adultas en producción.

### Regeneración de yemas de papaya de plantas de 3-4 meses de edad.

#### 1. Fase de establecimiento.

Origen del material vegetal: se tomaron 3 plantas de papaya del tipo "Criollo" de 3-4 meses de edad y se colocaron en el invernadero del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica, con el fin de controlar el estado sanitario y nutricional de las plantas y disminuir los posibles contaminantes *in vitro*. Para la obtención de una mayor cantidad de yemas se siguió el procedimiento descrito por Reuveni et al. (1990), que consistió en la aplicación en el tallo de las plantas de una pasta compuesta por lanolina, 500 ppm de BAP y 1000 ppm de ácido giberélico (AG3). Tres semanas después, cuando brotaron las yemas de plantas tratadas, se procedió a la inoculación de las mismas *in vitro*.

*Desinfección y disección:* En el momento de cortar las yemas, éstas se dividieron en dos grupos: uno se sumergió en alcohol de 95% durante unos segundos y el otro no. A todas las yemas se les cortaron los segmentos de pecíolo y hojas, de manera que quedara la menor cantidad de tejido. Posteriormente, se colocaron en bolsitas de malín y se lavaron bajo un flujo continuo de agua durante 45 minutos. Después de este tiempo se desinfectaron con hipoclorito de sodio 0,75% adicionado con tres gotas de Tween 80 durante 20 minutos. Por último, se lavaron 5 veces con agua destilada estéril en la cámara de transferencia.

La disección de las yemas se hizo con ayuda de un estereoscopio y dos jeringas con agujas a manera de pinza y bisturí. Se procuró en todos los casos dejar únicamente dos primordios, el meristema y una base.

*Medios de cultivo:* Se utilizaron dos medios de cultivo *in vitro*, que en una investigación preliminar produjeron los mejores resultados en yemas obtenidas a partir de plántulas germinadas *in vitro* (resultados no publicados): 1- MS + 0,5 mg/l de BAP y 2- MS + 1 mg/l de kinetina (kin). Con excepción de la concentración de los reguladores y el uso de un gelificante, Gel-Rite (2 gr/l), el medio se preparó según lo descrito por Murashige y Skoog (1962).

Se colocó una yema por frasco, para un total de 16 yemas en el medio con BAP y 15 en el medio con kinetina para el tratamiento con alcohol y, 8 Y 12 yemas para el tratamiento sin alcohol, respectivamente.

## 2. Multiplicación del material

Los explantes procedentes de la fase de establecimiento fueron colocados en tratamientos kinetina o BAP, en combinación o no con 1 mg/l de ácido giberélico (AG3). Estas pruebas se basan en los resultados de elongación obtenidos por DeWinaar (1988) con este último regulador. Además, una investigación preliminar con material proveniente de semilla y yemas de plántulas cultivadas *in vitro* recién germinadas produjo una buena respuesta en cuanto a multiplicación (resultados no publicados). Los medios utilizados se presentan a continuación:

- A- Yemas provenientes del medio MS + 0,5 mg/l de BAP
- \* MS + 0,3 mg/l de BAP + 1,0 mg/l de AG3 (7 explantes)
- \* MS + 1,0 mg/l de AG3 (8 explantes)
- \* MS + 0,3 mg/l de BAP (7 explantes)

- B- Yemas provenientes del medio MS + 1,0 mg/l kinetina
- \* MS + 0,5 mg/l kinetina. + 1,0 mg/l de AG3 (6 explantes)
- \* MS + 1,0 mg/l de AG3 (6 explantes)
- \* MS + 0,3 mg/l de BAP C7 explantes)

El material fue subcultivado dos veces en estos medios. Posteriormente, con base en la respuesta observada en los medios anteriores, se procedió a realizar diferentes adaptaciones del medio de cultivo, las cuales serán descritas conforme se presenten.

## Regeneración y multiplicación *in vitro* a partir de yemas de planta adultas en producción.

### 1. Experimento I.

*Origen del material vegetal:* Se tomaron 31 yemas provenientes de tallos laterales de plantas adultas de una plantación de papaya criolla situada cerca de la Estación Experimental Fabio Baudrit en Alajuela. Estas se sumergieron en alcohol de 95% en el momento de cortarlas.

*Desinfección:* el procedimiento fue idéntico al utilizado con las plantas de 3-4 meses de edad.

*Medio de cultivo:* se utilizó inicialmente el medio MS + 0,3 mg/l de BAP. Después de cuatro subcultivos todos los explantes se transfirieron a un medio MS + 0,3 mg/l de BAP + 0,1 mg/l de ANA. El pH se ajustó a 5,8 y se añadió agar como gelificante (10 g/l). El medio (aproximadamente 20 cc) fue vertido inicialmente en frascos pequeños (130 cc de contenido) del tipo de comida para bebés de tamaño y posteriormente autoclavado. Cuando la multiplicación de los explantes empezó a ser importante, se utilizaron frascos grandes (275 cc de contenido).

## 2. Experimento 2

Se procedió a realizar un segundo experimento, utilizando yemas de la misma plantación que en la prueba anterior.

La desinfección fue similar a la del experimento anterior, con la excepción que se evaluaron dos concentraciones de NaOCl: 0,75% y 0,5%. A ambas se les añadió una gota de Tween 80 por cada 100 cc.

En el tratamiento de 0,75% de NaOCl se colocaron 26 yemas y en el de 0,5% de NaOCl, 16.

Los medios de cultivo fueron los mismos que en el experimento anterior. A partir del segundo subcultivo las yemas del tratamiento de 0,5% de NaOCl se inocularon en un medio MS + 0,3 mg/l de BAP y las de 0,75% de NaOCl en un medio MS + 0,3 mg/l de BAP + 0,1 mg/l de ANA.

## RESULTADOS

### Experimentos con plantas de 3-4 meses de edad.

#### Fase de establecimiento

En primera instancia, se evaluó la decoloración (pérdida de color de la hoja que puede considerarse como degradación de la clorofila y del contenido celular) de los explantes después de los tratamientos de desinfección. Estos resultados se describen en el Cuadro 1.

Puede notarse que el proceso de degradación de los explantes fue mayor en presencia de alcohol y cuando el medio de cultivo contenía BAP.

En cuanto a la contaminación ésta fue muy baja y únicamente de procedencia fungosa, la cual sólo se observó en una yema cultivada en el tratamiento conteniendo Kinetina y sin alcohol.

**Cuadro 1.** Porcentajes de yemas de papaya que presentaron decoloración durante la fase de establecimiento, en función de la presencia o ausencia de alcohol y del medio de cultivo empleado. Resultados obtenidos al cabo de 2 meses.

Fecha	Alcohol 95%		Sin alcohol	
	NaOCl 0,75%	NaOCl 0,5%	NaOCl 0,75%	NaOCl 0,5%
<b>MS + 0,5 mg/l de BAP</b>				
10-11-92	28,5	40	0	0
13-11-92	28,5	40	0	0
27-11-92	28,5	40	0	0
7- 1-93	28,5	40	0	0
<b>MS + 1 mg/l de Kinetina</b>				
10-11-92	20	20	0	25
13-11-92	20	20	25	25
27-11-92	20	20	25	25
7- 1-93	20	20	25	25

En cuanto al desarrollo de las yemas, se dio inicialmente un engrosamiento leve en la base y en los primordios foliares de las mismas. Sin embargo, éste fue distinto en los dos medios de cultivo utilizados. En el medio con 0,5 mg/l de BAP, el volumen de las yemas aumentó con el tiempo hasta llegar a la formación de un callo en la base de algunos explantes (Cuadro 2). En la parte superior se observaron puntos de neoformación que le dieron a las yemas el aspecto de una "roseta". Dos meses después de inoculadas, el aumento en el tamaño de éstas era tal que podían observarse a simple vista.

**Cuadro 2.** Porcentaje de formación de callo en las yemas en BAP y Kinetina después de 5 meses en cultivo.

Fecha	MS + 0,5 BAP	MS + 1,0 kinetina
27-11-92	52,6	22,2
7-1-93	63	44
15-3-93	100	88,8

En el medio de cultivo con 1,0 mg/l de Kinetina se dio también un aumento de volumen en las yemas pero menor que en presencia de BAP. En este caso se observó primeramente una expansión de los primordios foliares, hasta el punto que formaron hojas completamente desarrolladas, que inhibieron en algunos casos la actividad meristemática de la yema. La presencia de callos en la base de las yemas se cuantificó hasta 3 meses después de la inoculación, momento en el que era más evidente su presencia. En el Cuadro 2 se presentan las evaluaciones en cuanto a la formación de callo en las bases de las yemas. El uso de BAP promueve una mayor formación de callo. Cinco meses después de la inoculación de las yemas, éstas no se encontraban aún en una fase de multiplicación semejante a la del material procedente de semillas (resultados no publicados). Aunque las yemas presentaban brotación, su proliferación fue baja.

## Fase de multiplicación

La transferencia del material anterior a los medios de mutiplicación se ilustra en el Cuadro 3.

Se observa que el porcentaje de formación de callo es bajo en todos los tratamientos, aunque es mayor cuando se utilizó BAP previamente. En contraposición, se da una clorosis muy generalizada y considerable en las yemas, independientemente del tratamiento. Esta disminuyó después del segundo subcultivo. Con respecto a la necrosis y la contaminación se obtuvieron porcentajes muy bajos, siendo la segunda causada por hongos.

Cuatro semanas después del segundo subcultivo, se dio en los explantes del tratamiento BAP 0,3mg/l + AG31,0 mg/l unengrosamiento a nivel de la base de las yemas, pero la proliferación de las mismas continuó siendo baja. En el tratamiento AG3 1,0 mg/l, se observó una tendencia similar a la del tratamiento anterior, mientras que con BAP 0,3 mg/l se dio una alta proliferación de las yemas en comparación con los otros tratamientos. En presencia de kinetina, el resultado obtenido fue similar, pero con un menor engrosamiento de la base.

La combinación de esta citoquinina con AG3 produjo el mismo efecto que con el uso de BAP 0,3 mg/l, aunque la proliferación obtenida fue menor cuando fue utilizada como tratamiento previo. Los resultados obtenidos muestran que la mayor proliferación fue obtenida al utilizar BAP 0,3 mg/l como único regulador en el medio.

La brotación de las yemas fue baja en todos los tratamientos, aún después del segundo subcultivo. Sin embargo, se notó un aumento de volumen en las yemas de los tratamientos procedentes de un tratamiento inicial con BAP. Cuando el tratamiento previo se hizo con kinetina, no se observó esta característica.

La baja respuesta en cuanto a brotación en los resultados obtenidos en la prueba anterior, eviden-

**Cuadro 3.** Respuestas de los explantes de papaya en el medio de multiplicación.

Fecha subcultivo	Tratamiento previo (mg/l)	Trat. multiplicación (mg/l)	Callo (%)	Clorosis (%)	Necrosis (%)	Contam. (%)
1-4-93	BAP 0,5	BAP ( 0,3) + AG3 (1,0)	0	0	0	0
		AG3 ( 1,0)	0	12,5	0	0
		BAP ( 0,3)	28,5	14,2	0	0
	kinetina 1,0	kin ( 0,5) + AG3 (1,0)	0	83,3	0	16,6
		AG3 (1,0)	16,6	100	0	16,6
		BAP ( 0,3)	0	42,8	0	28,5
22-4-93	BAP 0,5	BAP ( 0,3) + AG3 (1,0)	0	0	0	0
		BAP ( 0,3)	0	0	12,5	0
		AG3 ( 1,0)	37,5	0	0	0
	kinetina 1,0	kin ( 0,5) + AG3 (1,0)	0	50	0	0
		AG3 (1,0)	0	0	0	0
		BAP ( 0,3)	12,5	0	0	0

ció que las combinaciones utilizadas de reguladores no estimulaba el crecimiento y el desarrollo de los explantes, por lo que se discontinuó y se prosiguió con una segunda prueba de multiplicación, con el fin de determinar las condiciones más favorables para el establecimiento de esta fase en material proveniente de yemas. Para ello se evaluó el efecto de la aplicación de ANA en el medio de cultivo como factor de establecimiento de la dominancia apical en los tallos, con el fin de permitir el desarrollo de tallos elongados y reducir el número de rosetas.

#### **Respuesta de los explantes al medio MS + 0,3 mg/l BAP + 0,05 mg/l ANA.**

Se transfirieron todos los explantes de la prueba anterior a un medio MS + 0,3 mg/l de BAP que fue con el que se obtuvo una mejor proliferación. Del tratamiento A (yemas previamente cultivadas en un medio con BAP) se obtuvieron 23 explantes

y del B (yemas previamente cultivadas bajo un medio con Kinetina) 20 explantes, para un total de 43 explantes.

Dos meses después del último subcultivo se transfirió el material a un medio MS + 0,3 mg/l de BAP + 0,05 mg/l de ANA. Los medios de cultivo se gelificaron en un principio con Gel-Rite a razón de 2 g/l; pero luego se utilizó Agar a 10 g/l.

En el medio de cultivo MS + 0,3 de BAP, 46,5% de los explantes presentaron en forma considerable el proceso de vitrificación (desorden fisiológico caracterizado por una excesiva acumulación de agua, alteración de la formación de conexiones vasculares y ausencia de rigidez en las paredes celulares), además de clorosis y necrosis. Ante esta situación se desecharon aquellos explantes que manifestaron este síntoma, quedando una población de 20 explantes (53,5%).

Debido a los problemas anteriores y a la baja proliferación observados, todos los explantes fueron transferidos al medio MS + 0,3 mg/l de BAP + 0,05 mg/l de ANA (ácido naftalen-acético).

Dos meses después de cultivo en este medio se explantes, que empezaron a formar un importante número de brotes. Con el fin de caracterizar este material vegetal, se evaluaron los siguientes parámetros: la formación del callo y su diámetro, y la tasa de proliferación de tallos, clasificada en: alta (15 brotes o más); media (5-10 brotes) y baja (menos de 5 brotes). Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 4.

Se puede observar que muy pocos explantes formaron callo, aún después de dos meses de cultivo en presencia de BAP. La multiplicación fue sobre todo media y la extensión de las hojas neoformadas fue leve. Se observó un aumento en la proliferación de hojas y brotes en todos los explantes. Sin embargo solo en dos de ellos (14,2%) se formaron tallos definidos. Un fenómeno interesante fue observar que en todas las "macollas o arbutos" (explantes que formaron muchos tallos y hojas, simulando un arbusto en miniatura), varios tallos presentaron fenómenos de vitrificación y clorosis, aunque el fenómeno nunca fue generalizado a todo el explante, por lo que éstos continuaron su crecimiento. Sin embargo, debido a la aparición de este fenómeno, se procedió a cambiar el gelificante Gel-Rite, empleado hasta el momento, por Agar para determinar si esta era la causa de la anomalía.

Después del cuarto subcultivo en el medio con 0,3 mg/l BAP + 0,05 mg/l ANA solidificado con agar, la clorosis disminuyó a 51,8% y se eliminó la vitrificación. Todos los explantes formaron callos con un diámetro promedio de 1- 1,5 cm. En forma visual los tallos presentaron mejor apariencia, con hojas de menor tamaño (mejor proporcionadas con relación a la dimension del tallo) y menos succulentas.

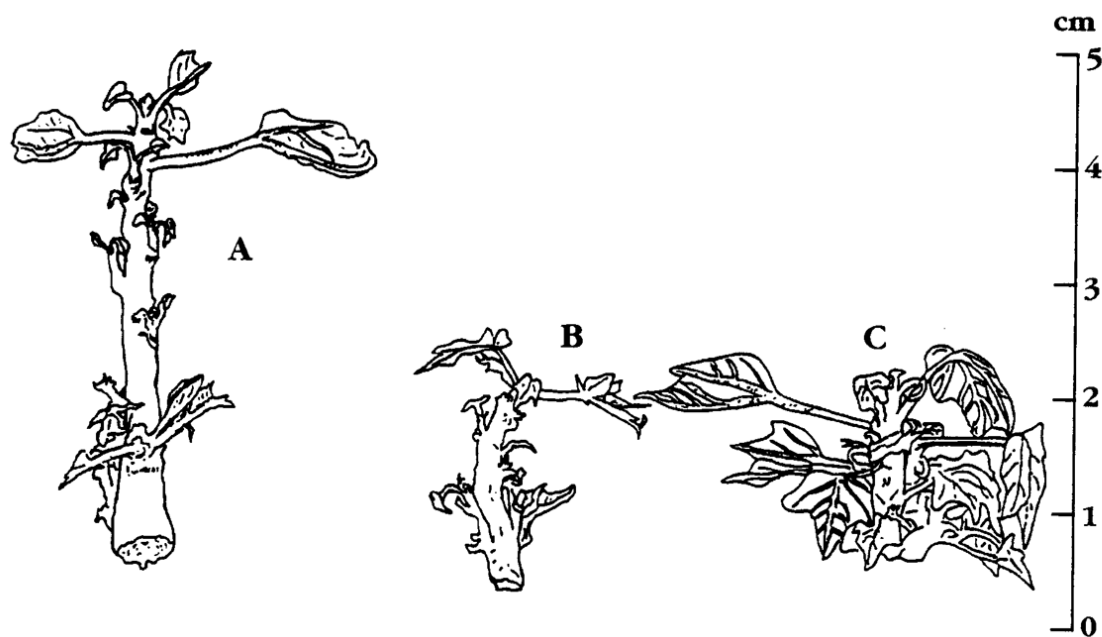
Los resultados anteriormente obtenidos llevaron a caracterizar mejor el efecto del ANA. Para ello, los explantes se cultivaron en un medio MS + 0,3 mg/l BAP conteniendo o no 0,1 mg/l de ANA. Los explantes de la prueba anterior fueron divididos en dos grupos y se transfirieron a cada uno de estos tratamientos. Los subcultivos se realizaron cada tres a cuatro semanas. Se evaluó la tasa de multiplicación de los explantes en cada tratamiento y el tipo de explantes producidos. Para ello, se estableció una clasificación basada en los tipos de tallos que se generan en la fase de multiplicación (Figura 1):

- Tipo A: ejes únicos, dominantes sobre la masa de proliferación. Hojas bien desarrolladas, tamaño aproximado: 2,1 o más cm.
- Tipo B: tallos únicos o en grupos de 2-3 con una base de callo. Brotación media a alta, tamaño entre 1,1 - 2,0 cm.
- Tipo C: masa de proliferación con una gran cantidad de brotes y tallitos, alta proporción de hojas de mediano desarrollo, tamaño aproximado de 0,25 a 1,0 cm.

**Cuadro 4.** Evaluación de yemas de papaya cultivadas sobre un medio MS + 0,3 mg/l de BAP + 0,05 mg/l ANA dos meses después del subcultivo.

Fecha	Callo (%)	Diámetro (cm)	Proliferación (% de tallos)*		
			Alta	Media	Baja
25-7-93	30	0,85	35	50	15

\* porcentaje expresado con base en un total de 20 tallos.



**Fig. 1.** Tipos morfológicos observados durante la utlipicación *in vitro* de tallos de papaya. Tipo A: eje único, dominante. Hojas bien desarrolladas; Tipo B: tallos únicos o en grupos de 2-3, con callo en la base; dimensiones medianas; Tipo C: tallos con abundante proliferación axilar, de dimensiones reducidas.

Los resultados obtenidos en esta prueba se resumen en los Cuadros 5 y 6. El uso de únicamente BAP (Cuadro 5) promovió inicialmente una mayor formación de tallos de tipo B en comparación con la presencia en el medio de ANA (Cuadro 6). Sin embargo, en este último medio se observa un incremento constante de la totalidad de explantes, y en particular de tallos tipo A, mientras que con el uso de únicamente BAP se aprecia a partir del mes de febrero una disminución en la proliferación de tallos tipo C. En presencia de auxina, se puede notar un mejor desarrollo de las hojas, mientras que una presencia continua de BAP produce plantas con hojas más pequeñas y suculentas.

### **Propagación mediante el uso de yemas de plantas adultas en producción**

Inicialmente, se evaluó el porcentaje de contaminación y de necrosis de las yemas después de la desinfección. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 7. Estos evidencian una alta contaminación del material proveniente de condiciones de campo y una mayor sensibilidad de los tejidos al tratamiento de desinfección, en comparación con los tratamientos de plantas jóvenes en invernadero.

Las cuatro yemas que no se contaminaron se mantuvieron en el medio de cultivo inicial MS + 0,3 mg/l de BAP durante 3 semanas, después de las



**Cuadro 5.** Evaluación de la tasa de multiplicación en el medio conteniendo 0,3 mg/l de BAP.

Fecha	Tipo de tallos formados*			Total (#)	Contaminación (%)
	A	B	C		
11-11-93	1 (1,3)	12 (16,6)	59 (81,9)	72	0
14-12-93	1 (0,9)	30 (25,8)	85 (73,2)	116	3,4
4-02-94**	0 (0,0)	51 (45,9)	60 (54,0)	111	0

\* los números entre paréntesis corresponden a los porcentajes.

\*\* a partir de esta fecha, todo el material se transfirió al medio 0,3 mg/l de BAP + 0,1 mg/l de ANA. Estos resultados no están contabilizados en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Evaluación de la tasa de multiplicación en el medio MS + 0,3 mg/l de BAP + 0,1 mg/l de ANA.

Fecha	Tipo de tallos formados*			Total (#)	Contaminación (%)
	A	B	C		
11-11-93	0	8 (11,1)	64 (88,8)	72	0
14-12-93	0	12 (10,9)	98 (89,0)	110	0
4-02-94	1 (0,7)	28 (20,2)	109 (79,0)	138	0
1-03-94	5 (2,7)	86 (46,4)	94 (50,8)	185	4,86
23-03-94	36 (17,3)	83 (39,9)	89 (42,7)	208	6,25
5-4-94	9 (5,3)	79 (46,1)	83 (48,5)	171	1,16
4-5-94	18 (13,5)	81 (60,0)	36 (26,6)	135	0

\* Los números entre paréntesis corresponden a los porcentajes.

**Cuadro 7.** Número de yemas axilares de papaya adultas contaminadas y con decoloración.

Fecha	Necrosis	Contaminación		Yemas sin contaminar
		Hongos	Bacteria	
6-5-93	0	0	0	31(100)
17-5-93	16(51,6)	0	11(35,4)	4(12,9)
28-5-93	0	0	0	4(12,9)

Nota: Los números entre paréntesis corresponden a porcentajes

cuales se realizó el primer subcultivo a medio fresco. Al cabo de tres subcultivos las yemas no proliferaron, observándose únicamente un aumento de volumen en la base.

Cuatro meses después de iniciada la prueba, las yemas mostraron cierta proliferación. En este momento se transfirieron dos yemas a un medio MS + 0,3 mg/l de BAP + 0,1 ANA y las otras dos se mantuvieron en el medio con 0,3 mg/l de BAP.

En estos medios de cultivo se dieron diferencias en la proliferación, dependiendo de los reguladores aplicados. Las yemas que se mantuvieron en 0,3 mg/l de BAP mostraron una multiplicación muy baja en comparación a las cultivadas en 0,3 mg/l de BAP + 0,1 mg/l de ANA. Las yemas con estos reguladores formaron callos y brotes más definidos, con ejes únicos de 1,0 cm.

A los seis meses de iniciada la prueba, dado la mejor apariencia y crecimiento de los tallos en el medio con 0,3 mg/l de BAP + 0,1 mg/l de ANA, todos los explantes se subcultivaron en este medio. Las yemas se seccionaron y se obtuvieron 19 explantes, que se clasificaron según las características de los tallos ilustrada en la Figura 1 y descrita pre-

viamente en la sección anterior. Además, se inició la cuantificación de la tasa de multiplicación de los explantes. Los resultados obtenidos se resumen en el Cuadro 8.

Los resultados anteriores mostraron una importante formación de tallos pequeños (tipo C), aunque se puede observar con el tiempo un aumento en la formación de tallos tipo A y un aumento constante en la tasa de multiplicación, que se evidencia en el número de tallos totales formados.

Ante los resultados obtenidos, se realizó un segundo experimento con el fin de comprobar los resultados anteriores. El material vegetal adulto utilizado proviene de la misma plantación que el experimento 1.

Nuevamente, se evaluó la contaminación en cada uno de los tratamientos de desinfección. En presencia de NaOCl 0,5% se contaminaron 15 explantes (57,6%), en comparación con 5 (31,3%) en con 0,75% de NaOCl. Por su parte la decoloración fue de 3,8% y de 6,3%, respectivamente.

Después de esta fecha no se dio más contaminación en las yemas. En general se observa que el

**Cuadro 8.** Tasa de multiplicación de yemas de plantas adultas de papaya cultivadas en un medio MS + 0,3 mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA

Fecha	Número de tallos			Total (#)	Contaminación (%)
	A	B	C		
28-9-93	0	0	8(100)	8	0
1-11-93	1(5,3)	7(36,8)	11(57,8)	19	0
19-11-93	2(4,2)	11(22,9)	35(72,9)	48	0
17-12-93	1(1,0)	8(8,24)	88(90,7)	97	0
4-1-94	1(1,2)	8(9,41)	76(89,4)	85	12,3
10-2-94	7(5,8)	30(24,7)	84(69,4)	121	0
3-3-94	15(10,3)	62(42,7)	68(46,8)	145	0
14-4-94	12(14,4)	49(59,0)	22(26,5)	* 83	0

Nota: los números entre paréntesis corresponden a porcentajes; \*: Se presentó material con clorosis intervenal y acucharamiento en las hojas que se desechó por lo que disminuyó la tasa de multiplicación.

uso de NaOCl a 0,75% produce resultados satisfactorios, en particular respecto a la contaminación. Un mes después de iniciada la prueba, se observó un aumento en el tamaño de los primordios foliares de las yemas, las cuales son visibles a simple vista (Figura 2A) pero no hubo proliferación. Durante el primer subcultivo se eliminaron los primordios foliares.

A las seis semanas se observaron pequeños brotes en el centro de las yemas así como un engrosamiento de las bases. No hubo formación de callos.

A partir del segundo subcultivo las yemas se dividieron en dos tratamientos con reguladores. Una parte se inoculó en un medio MS + 0,3 mg/l de BAP y la otra en MS + 0,3 mg/l de BAP + 0,1 mg/l de ANA.

Después de la segunda transferencia se dio una mayor proliferación en todas las yemas y se observó la formación de callo en la base (Figura 2B). En cada subcultivo se subdividieron los explantes. Aunque en forma general se observó una menor proliferación en el tratamiento con ANA y BAP, la formación de ejes únicos es muy baja en ambos tratamientos. Se puede decir que 4 meses después del inicio de la prueba todos los explantes se clasificaron como tallos de tipo C. Sin embargo, se observa que conforme se incrementan los subcultivos el número de tallos de mayor tamaño y apariencia se incrementan (Figura 2C). En general, la mayor proliferación se obtiene utilizando solamente BAP en el medio. Pero nuevamente, es en presencia de ANA que se obtienen explantes con un desarrollo y apariencia morfológica muy similar a las plantas observadas en condiciones de campo, particularmente en el caso de las hojas (Figura 2D).

En el Cuadro 9 se presentan los resultados de la tasa de multiplicación de los explantes desde el inicio de la prueba.

Ante la buena tasa de multiplicación observada en el cuadro anterior, se decidió iniciar el estudio

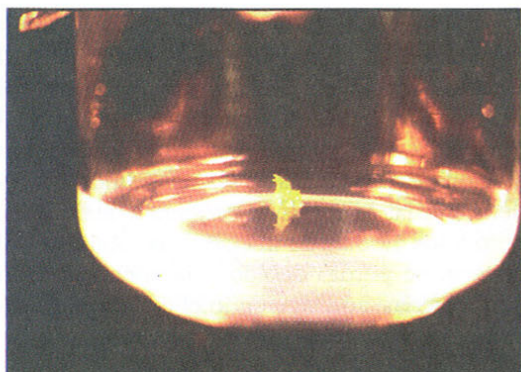
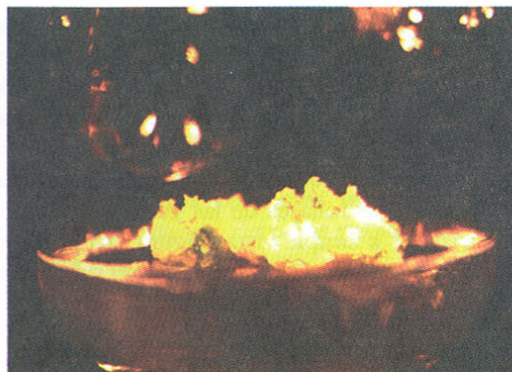
con material proveniente de otras zonas del país, con el fin de estudiar su comportamiento *in vitro*. Para ello, se realizaron dos pruebas adicionales con yemas de plantas adultas procedentes de las regiones de Paquera y de Orotina, pero a los 12 días de iniciadas, la totalidad del material se perdió debido a la contaminación por bacterias, aún siguiendo el mismo procedimiento de desinfección que en las pruebas 1 y 2.

## DISCUSION

El efecto del alcohol en el proceso de desinfección es muy evidente en los resultados obtenidos y muestra la necesidad de estudiar tiempos de exposición menores a esta sustancia o la necesidad real de su aplicación, ya que afecta considerablemente la integridad del explante, disminuyendo en muchos casos desarrollo posterior.

Es interesante notar una diferencia importante dependiendo de la citoquinina evaluada, ya que los resultados obtenidos en la fase de establecimiento indican la existencia de diferencias morfológicas en el explante. La kinetina refuerza el desarrollo de estructuras ya existentes, lo cual no ocurre con la BAP, sustancia mucho más activa que la kinetina (Moore, 1989), que induce con facilidad la formación de nuevas yemas así como el rápido crecimiento de callo. En general, la kinetina refuerza el desarrollo de hojas, que predominan en el explante, inclusive sobre el meristema de la yema, por lo que al final se observa una hoja de grandes proporciones, debido a su dominancia en lo que respecta a crecimiento y movilización de nutrientes. Esta condición se da a expensas de la yema, que se mantiene inhibida y no crece. Este mismo fenómeno fue observado por Guevara (1981) en un estudio previo con yemas de plantas de 6 meses de edad en presencia de kinetina.

Los resultados en la fase inicial de multiplicación indican que la combinación del BAP y de la Kinetina con la giberelina, contrariamente a lo esperado, detiene considerablemente la regeneración de

A *Carica papaya*B *Carica papaya*C *Carica papaya*D *Carica papaya*

**Fig. 2.** Regeneración y multiplicación de la papaya a partir de yemas de material adulto. A: yema después de 4 semanas. B: Aspecto de las yemas después de 10 semanas de cultivo. C: Proliferación de tallos de tipo C al cabo de 4 meses. D: Formación y multiplicación de tallos normales en presencia de ANA, después de 8 meses de cultivo.

**Cuadro 9.** Tasa de multiplicación de tallos (expresada en número de tallos) obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de yemas axilares provenientes de plantas de papaya adultas.

Fecha	0,3 mg/l BAP			0,3 mg/l BAP + 0,1 mg/L ANA		
	Tipos de tallos			Tipos de tallos		
	A	B	C	A	B	C
28-8-93	0	0	24	0	0	14
29-10-93	0	0	56	0	0	25
23-11-93	0	6	100	0	4	52
17-12-93	0	12	157	0	11	88
18-1-94	0	25	105	0	25	108
25-2-94	3	81	148	0	8	182
14-3-94	0*	42*	75*	2	75	62

las yemas. De Winnaar (1988) considera que existe un antagonismo entre la multiplicación y la elongación de los tallos. La autora afirma que este podría disminuirse subcultivando las macollas en un medio de proliferación con 1,0 mg/l de AG3, por varios ciclos. Sin embargo, en nuestras condiciones el empleo de AG3 en la fase de multiplicación muestra una situación completamente contraria, ya que los tallos no mostraron ni proliferación ni elongación. Además, la aplicación de ácido giberélico como único regulador no fue suficiente para contrarrestar el efecto antagónico mencionado por De Winnaar (1988), lo cual sí se logró con la combinación BAP y ANA.

Estas diferencias en las respuestas de los explantes puede deberse a diferencias genéticas entre las variedades utilizadas en nuestras condiciones (criollas) y las del experimento de De Winnaar ("Sunrise" y "Solo"). De igual forma De Winnaar observó diferencias entre clones de un mismo cultivar.

De los resultados obtenidos se concluye que para la propagación clonal de las variedades criollas de papaya, las yemas deben establecerse primero en una fase de multiplicación, con utilización únicamente de BAP y luego proceder a la elonga-

ción, añadiendo al medio ANA. Este proceso difiere de lo observado por Litz y Connover (1978) quienes emplearon continuamente la combinación de ambos reguladores (y en mayores concentraciones) para realizar todo el proceso de obtención de tallos.

Los resultados obtenidos con yemas provenientes de plantas adultas muestran que es posible realizar una multiplicación masiva de este tipo de material. La metodología empleada, derivada de los resultados obtenidos a partir del uso de plantas jóvenes de 3-4 meses cultivadas *in vitro* concuerda bastante bien, lo que permitió ahorrar tiempo en este paso. Uno de los mayores problemas lo constituye sin embargo, la ausencia de elongación de los tallos en el medio de multiplicación, que en su mayoría pertenecen al tipo C (Cuadro 9), y que por su tamaño no logran el desarrollo de raíces (Reuveni *et al*, 1990). Este proceso sugiere que estos tallos no tienen una fuerte dominancia apical, ya que en general, tallos con esta característica logran elongarse satisfactoriamente. Es conocido que el BAP promueve una alta proliferación meristemática, muchas veces en detrimento de la elongación. Las citoquininas antagonizan en general a la dominancia apical (Moore 1989). Es posible entonces que el

continuo estímulo de inducción de formación de yemas, causado por la presencia de BAP en el medio de cultivo, se oponga a la dominancia de un solo eje dentro de la macolla en el medio de proliferación. Se sabe en efecto, que una aplicación continua de BAP a una yema promueve su liberación de la dominancia apical (Li y Bangerth 1992). Reuveni et al. (1990) han sugerido el uso de kinetina para favorecer la elongación en el medio de cultivo, en sustitución del BAP, por ser menos activa en cuanto a proliferación axilar que la segunda. Esto ha sido observado en tallos originados de semillas, en donde aún en presencia de kinetina en el medio ha sido observada la elongación y formación de raíces (Guevara 1981). Sin embargo, en las condiciones de la investigación realizada en este trabajo, la kinetina no ha sido satisfactoria en la elongación del material, como tampoco el empleo de giberelinas.

La pérdida total de material proveniente de las regiones de Paquera y de Orotina evidencia la dificultad de establecimiento de material adulto a partir de yemas tomadas directamente a partir de campo. Ello confirma los resultados obtenidos previamente (Sancho y Guevara 1991). La disponibilidad de un invernadero de techo alto podría permitir disponer de plantas bajo condiciones controladas y así disponer de material con alto grado de higiene. Sin embargo, es probable que el mejor procedimiento consista en estimular el crecimiento de brotes laterales de papayas adultas en producción en condiciones de campo, mediante la aplicación de reguladores, y poder posteriormente enraizar/os según la técnica descrita por Reuveni et al. (1990). Se dispondría así de material adulto que se puede trasladar y mantener en condiciones de invernadero, evitando los problemas de alta contaminación observados con material de campo directamente establecido *in vitro*. Este material presentaría probablemente ciertas condiciones de juvenilidad que ya han sido observadas en otras especies multiplicadas

por injerto. Al respecto, Dalsaso y Guevara (1989) sólo pudieron obtener regeneración y multiplicación *in vitro* de plantas de aguacate adultas del cv. Fuerte cuando estas cultivaron y mantuvieron en invernadero. El uso del mismo material (yemas), pero cultivado en las condiciones de campo en la zona de Fraijanes, nunca permitió obtener más allá de un simple aumento de volumen del material.

La investigación desarrollada en el presente trabajo ha permitido establecer un protocolo satisfactorio para la regeneración y multiplicación de plantas adultas de papaya. Costa Rica se encuentra ubicada en la zona de origen de las Caricaceas, por lo que la diversidad genética existente es muy amplia. De hecho, muchos cultivares obtenidos en otros países tienen como progenitores material genético proveniente en primera instancia de Costa Rica (Dalmo Giacometti, EMBRAP A, Brasil, comunicación personal, 1988). Esta mayor variabilidad sugiere que la respuesta al cultivo del material, tanto *in vitro* como en el campo pueda ser muy diferente. Así, *Carica papaya* ha sido descrita como una planta tipo monocaule, sin ramificación lateral (Hallé y Oldeman 1970). Pero es muy frecuente observar en Costa Rica, y en forma natural, la presencia de múltiples ramificaciones en plantas adultas de papaya. Estas ramificaciones laterales son las que han sido utilizadas en el presente trabajo y se están estudiando para su utilización en el protocolo descrito por Reuveni *et al.* (1990) para enraizamiento de estacas.

En estos momentos, se ha continuado con los estudios de multiplicación del material adulto y joven, lo cual ha permitido la obtención de tasas altas de multiplicación elevadas con plantas adultas. Al respecto, es importante señalar el hecho de que se haya podido mantener en multiplicación material adulto por un período prolongado de tiempo, superior al límite mencionado por Litz y Conner (1981) de 13 subcultivos.

## LITERATURA CITADA

- DALSASO, 10M.; GUEVARA, E. 1990. Propagación donal *in vitro* del aguacate (*Persea americana*) cv. Fuerte. Agronomía Costarricense (C.R) 13(1): 61-72
- DEBERGH, P. 1987. Improving micropropagation. Newsletter (L.A.P.T.C.) 51:2-10.
- DE WINNAR, W. 1988. Clonal propagation of papaya *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 12:305-310.
- DREW, R.A. 1988. Rapid donal propagation of papaya *in vitro* from field - grown trees. Hortscience 23(3):609-611.
- DREW, RA; SMITH, N.G. 1986. Growth of apical and lateral buds of papaw (*Carica papaya* L.) as affected by nutritional and hormonal factors J. Hort. Sci. 61(4): 535-543.
- GUEVARA, E. 1981. Propagación donal *in vitro* de la papaya (*Carica papaya* L.). Tesis Ing. Agr. Facultad de Agronomía, Universidad de Costa Rica, San Pedro, Costa Rica. 65 p.
- HALLE, F.; OLDEMAN, R.A.A. 1970. Essai sur l'architecture et la dynamique de croissance des arbres tropicaux. Masson, Paris, Francia. 178 p.
- LI, C.J.; BANGERTH, F. 1992. The possible role of cytokinins, ethylene and indoleacetic acid in apical dominance.. In: Progress in Plant Growth Regulation. De. by Karssen, C.M.; van Loon, L.C.; Vreugdenhill, D. Kluwer Academic publisher, Holanda. p. 431-436.
- LITZ, RE. 1983. Papaya. In: Handbook of plant cell culture. Ed. by Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.v.; Yamada, Y. Can. Macmillan. Plenum Press, N.Y p. 349-368.
- LITZ, RE.; CONNOVER, R A. 1981. Effect of sex type, season and other factors on *in vitro* establishment and culture of *Carica papaya* explants. J. Amer. Soc. Hort. Sci 106: 792-94.
- LITZ, RE.; CONNOVER, R. A. 1978. *in vitro* propagation of papaya. Hortscience 13(3): 241-242.
- MOORE, T. 1989. Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. 2nd. ed. Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania. p. 170.
- RAJEEVAN, M.S; PANDEY, R.M. 1986. Lateral bud culture of papaya (*Carica papaya* L.) for clonal propagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 6:181-188.
- REUVENI, O; SHLESINGER, D. R; LAVI, v. 1990. *In vitro* donal propagation of dioecious *Carica papaya*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 20:41-46
- SANCHO, G.; GUEVARA, E. 1991. El cultivo *in vitro* de yemas axilares de papaya (*Carica papaya* L.). I. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la contaminación inicial de explantes. Boletín Tec. Estación Exptl. Fabio Baudrit M. 24(1):14 - 26.